製品コード PH017

研究用

TaKaRa

# PrimerArray® Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human)

説明書

v201308

PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) は、PrimerArray Hepatic Differentiation (Human)（製品コード PH017）で得られたデータを解析するためのツールで、コントロールサンプルと 1 種類の未知サンプル間の比較が可能です。リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで算出された Ct 値を用いて ΔΔ Ct 法による相対定量解析を行い、結果をグラフで表示します。

＊ PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) は、Microsoft® Office Excel® で作成されたマクロを含むファイルです。このファイルは、以下のバージョンのオペレーションシステム（OS）および Microsoft® Office Excel® で正常に動作することを確認しています。
Windows® XP operating system
Microsoft® Office Excel® 2003
Microsoft® Office Excel® 2007

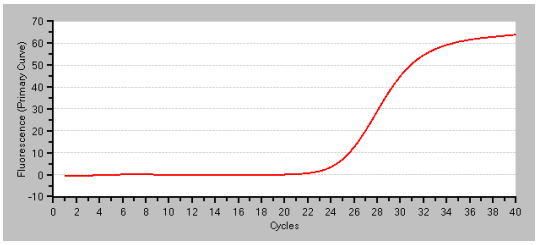
＊ 本解析ツールは、タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。
http://www.takara-bio.co.jp/primerarray_tool3/

## I. Ct 値の算出と出力

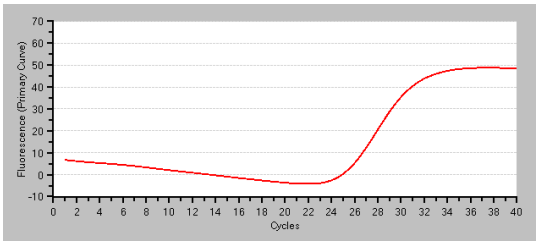
リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析パラメーターを設定し、Ct 値を算出します。（操作方法の詳細は、各リアルタイム PCR 解析ソフトウェアの取扱説明書をご参照ください。）

（1）解析パラメーターの設定
ほとんどのリアルタイム PCR 解析ソフトウェアでは解析パラメーターが自動で設定されますが、まず、その設定が正しいことを確認し、適切でない場合にはマニュアルで設定し直してください。

ベースライン領域
増幅曲線が立ち上る手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が狭すぎる場合、十分なベースライン補正がなされません。逆に、ベースライン領域が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。

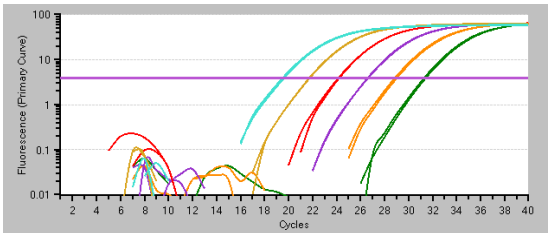



正しくベースラインが設定された例




ベースライン領域が広すぎる例

Threshold（閾値）
PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数（Log scale）で表示した際に増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。




正しく Threshold（閾値）が設定された例

（2）Ct 値の算出
Ct 値はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアにより自動的に算出されます。

（3）データの出力
Ct 値を Microsoft® Office Excel® または CSV などの形式で出力します（出力形式はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアによって異なります）。

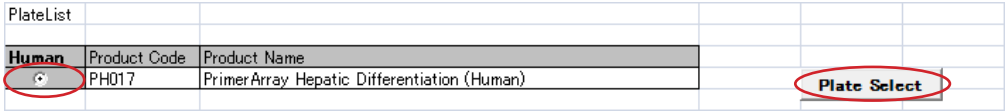
※ リアルタイム PCR 解析ソフトウェアによっては、サンプル情報が設定されていないウェルや解析から除外（Omit）したウェルのデータ行は出力されないことがあります。そのような状態では、PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) へのデータ入力の際に誤りが生じやすくなりますので、全ウェルのデータが表示される状態で出力を行ってください。

## II. 相対定量解析

PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) を用いてΔΔ Ct 法による相対定量解析を行います。

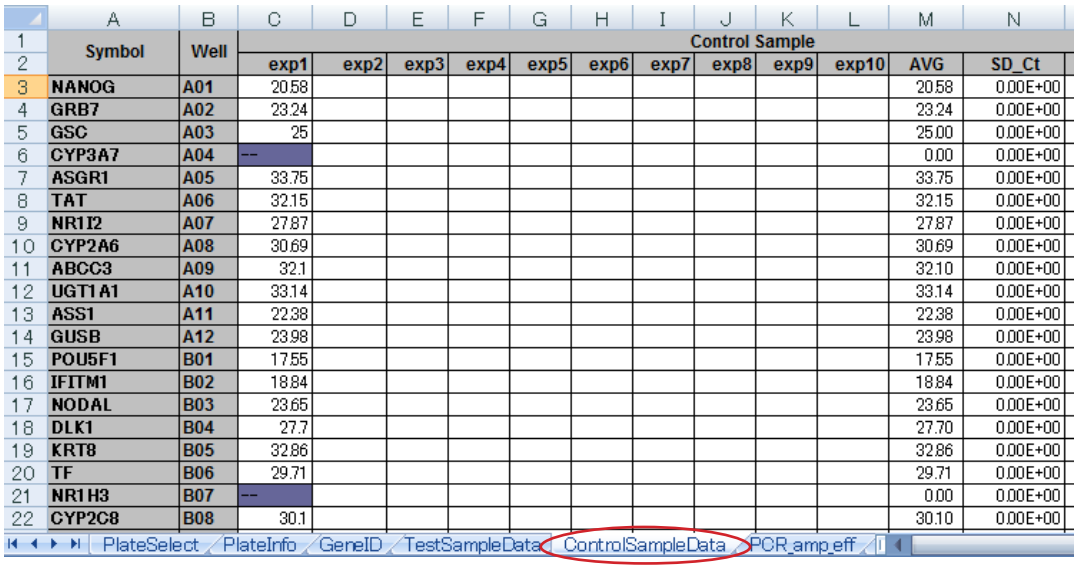
（1）PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) の起動
PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) のファイル（PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation.xls）を開きます。

（2）Plate の選択
PrimerArray の種類にチェックが入っていることを確認し、Plate Select ボタンをクリックします。



(3) Control Sample データの入力

Plate Select ボタンをクリックすると、Control Sample のデータを入力するシート (ControlSampleData) に変わります。exp1 (C 列)、exp2 (D 列)、exp3 (E 列)・・・の順に Ct 値を入力します (リアルタイム PCR 解析ソフトウェアから出力した Ct 値をコピー＆ペーストすると簡単に入力できます)。反復実験の結果は、最大 10 個まで入力することができます。



| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Symbol | Well | Control Sample | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | exp1 | exp2 | exp3 | exp4 | exp5 | exp6 | exp7 | exp8 | exp9 | exp10 | AVG | SD_Ct |
| 3 | NANOG | A01 | 20.58 | | | | | | | | | | 20.58 | 0.00E+00 |
| 4 | GRB7 | A02 | 23.24 | | | | | | | | | | 23.24 | 0.00E+00 |
| 5 | GSC | A03 | 25 | | | | | | | | | | 25.00 | 0.00E+00 |
| 6 | CYP3A7 | A04 | -- | | | | | | | | | | 0.00 | 0.00E+00 |
| 7 | ASGR1 | A05 | 33.75 | | | | | | | | | | 33.75 | 0.00E+00 |
| 8 | TAT | A06 | 32.15 | | | | | | | | | | 32.15 | 0.00E+00 |
| 9 | NR1I2 | A07 | 27.87 | | | | | | | | | | 27.87 | 0.00E+00 |
| 10 | CYP2A6 | A08 | 30.69 | | | | | | | | | | 30.69 | 0.00E+00 |
| 11 | ABCC3 | A09 | 32.1 | | | | | | | | | | 32.10 | 0.00E+00 |
| 12 | UGT1A1 | A10 | 33.14 | | | | | | | | | | 33.14 | 0.00E+00 |
| 13 | ASS1 | A11 | 22.38 | | | | | | | | | | 22.38 | 0.00E+00 |
| 14 | GUSB | A12 | 23.98 | | | | | | | | | | 23.98 | 0.00E+00 |
| 15 | POU5F1 | B01 | 17.55 | | | | | | | | | | 17.55 | 0.00E+00 |
| 16 | IFITM1 | B02 | 18.84 | | | | | | | | | | 18.84 | 0.00E+00 |
| 17 | NODAL | B03 | 23.65 | | | | | | | | | | 23.65 | 0.00E+00 |
| 18 | DLK1 | B04 | 27.7 | | | | | | | | | | 27.70 | 0.00E+00 |
| 19 | KRT8 | B05 | 32.86 | | | | | | | | | | 32.86 | 0.00E+00 |
| 20 | TF | B06 | 29.71 | | | | | | | | | | 29.71 | 0.00E+00 |
| 21 | NR1H3 | B07 | -- | | | | | | | | | | 0.00 | 0.00E+00 |
| 22 | CYP2C8 | B08 | 30.1 | | | | | | | | | | 30.10 | 0.00E+00 |

PlateSelect / PlateInfo / GeneID / TestSampleData / ControlSampleData / PCR_amp_eff

(4) Test Sample データの入力

次に、Test Sample 入力用のシート (TestSampleData) を選択します。Control Sample と同じ要領で Ct 値を入力します。入力が完了したら set sample data ボタンをクリックします。

データのクリア

データ入力をやり直す場合には clear ボタンをクリックします。すると、入力したすべてのデータが消去されます。

Ct 値の cutoff 値の設定

Ct 値の cutoff 値を設定すると、一定以上の Ct 値のデータを解析から除外することができます。デフォルトでは 35 サイクルに設定されており、Ct 値が 35 以上のデータは解析から除外されます。cutoff 値を変更する場合には、この Ct cutoff value の値を変更します。

(5) Normalization Factor の算出

set sample data ボタンをクリックすると、Normalization Factor 算出のシート（normalization_factors）に変わります。補正に用いるハウスキーピング遺伝子（HKG）＊1 をチェックボックスで選択し、NF value ボタンをクリックします。すると、Normalization Factor が算出され、自動的に相対定量解析が行われます。

| | HKG | Test Sample | | Control Sample | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Quantity | SD_Q | Quantity | SD_Q |
| ☑ | GUSB | 1.01E-07 | 0.00E+00 | 6.04E-08 | 0.00E+00 |
| ☑ | HPRT1 | 2.11E-08 | 0.00E+00 | 2.82E-07 | 0.00E+00 |
| ☑ | PGK1 | 1.21E-07 | 0.00E+00 | 6.70E-07 | 0.00E+00 |
| ☑ | ACTB | 2.70E-06 | 0.00E+00 | 1.61E-05 | 0.00E+00 |
| ☑ | GAPDH | 2.19E-06 | 0.00E+00 | 9.20E-06 | 0.00E+00 |
| ☑ | TBP | 7.61E-09 | 0.00E+00 | 7.60E-08 | 0.00E+00 |
| ☑ | B2M | 1.64E-06 | 0.00E+00 | 2.09E-07 | 0.00E+00 |
| ☑ | PPIA | 1.35E-06 | 0.00E+00 | 5.74E-06 | 0.00E+00 |

NF value

| normalization factors | Quantity | SD_Q |
|---|---|---|
| NF Test | 2.67E-07 | 0.00E+00 |
| NF Control | 7.92E-07 | 0.00E+00 |

＊1： ハウスキーピング遺伝子の選択について

Normalization Factor は反応に用いた鋳型量を補正するための係数で、サンプル間で発現量が安定しているハウスキーピング遺伝子（HKG）を指標として算出します。サンプル間で発現量が異なるハウスキーピング遺伝子を補正に用いると結果が不正確になりますので、その選択には注意が必要です。適切なハウスキーピング遺伝子を選択するには、実験的に確かめるか＊、既知の情報（生物学的知見、文献情報、マイクロアレイの解析結果等）を利用します。そのような情報も得られない場合には、全種類のハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして用いるか、RNA 量の補正を行わずに（全種類を非選択とする）解析を行います。

＊：参考


- Housekeeping Gene Primer Set（製品コード 3790）説明書
- geNorm manual
  http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf
- Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;**3** (7): RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

(6) 解析結果の確認

解析後、Fold Difference の 3D profile が表示されます。その他の結果を見るには、各シートを選択します。

Fold Difference

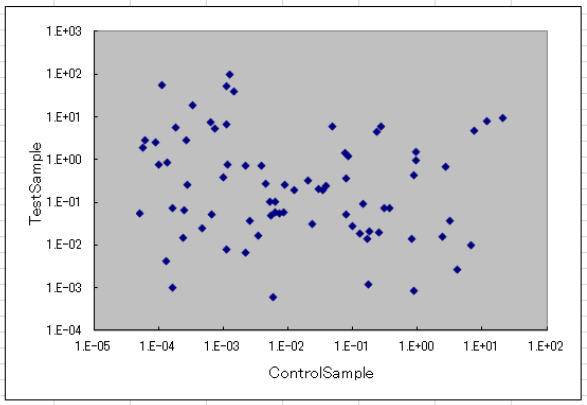
Control Sample を 1 とした場合の Test Sample の相対定量値および標準偏差の一覧です。（標準偏差は、反復実験を行った場合のみ表示されます。）

| Fold Difference | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | expression level | | SD | |
| Well | Symbol | Test Sample | Contorol Sample | Test Sample | Control Sample |
| A01 | NANOG | 0.02 | 1.00E+00 | | |
| A02 | GRB7 | 0.16 | 1.00E+00 | | |
| A03 | GSC | | 1.00E+00 | | |
| A04 | CYP3A7 | | | | |
| A05 | ASGR1 | 3.08E+04 | 1.00E+00 | | |
| A06 | TAT | 1.12E+04 | 1.00E+00 | | |
| A07 | NR1I2 | 21.11 | 1.00E+00 | | |
| A08 | CYP2A6 | 75.38E+02 | 1.00E+00 | | |
| A09 | ABCC3 | 989.12 | 1.00E+00 | | |
| A10 | UGT1A1 | 67.47E+02 | 1.00E+00 | | |
| A11 | ASS1 | 20.11 | 1.00E+00 | | |
| A12 | GUSB | 4.96 | 1.00E+00 | | |
| B01 | POU5F1 | 0.00 | 1.00E+00 | | |
| B02 | IFITM1 | 0.26 | 1.00E+00 | | |
| B03 | NODAL | | 1.00E+00 | | |
| B04 | DLK1 | 0.11 | 1.00E+00 | | |
| B05 | KRT8 | 6.63 | 1.00E+00 | | |
| B06 | TF | 2.89E+04 | 1.00E+00 | | |
| B07 | NR1H3 | | | | |
| B08 | CYP2C8 | 63.83E+02 | 1.00E+00 | | |
| B09 | ABCG2 | 7.67 | 1.00E+00 | | |
| B10 | GSTA2 | 1.29E+04 | 1.00E+00 | | |
| B11 | CPS1 | 132.51 | 1.00E+00 | | |
| B12 | HPRT1 | 0.22 | 1.00E+00 | | |

Scatter plot

左の表は、Control Sample に対して相対化する前の定量値と標準偏差の一覧です。その右には、それらの値が Scatter plot で表示されます。

| Scatter Plot | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | expression level | | SD | |
| Well | Symbol | Test Sample | Control Sample | Test Sample | Contorol Sample |
| A01 | NANOG | 1.49E-02 | 8.06E-01 | | |
| A02 | GRB7 | 2.00E-02 | 1.28E-01 | | |
| A03 | GSC | | 3.76E-02 | | |
| A04 | CYP3A7 | 1.54E-01 | | | |
| A05 | ASGR1 | 2.69E+00 | 8.74E-05 | | |
| A06 | TAT | 2.97E+00 | 2.65E-04 | | |
| A07 | NR1I2 | 1.09E-01 | 5.15E-03 | | |
| A08 | CYP2A6 | 5.50E+00 | 7.29E-04 | | |
| A09 | ABCC3 | 2.71E-01 | 2.74E-04 | | |
| A10 | UGT1A1 | 9.00E-01 | 1.33E-04 | | |
| A11 | ASS1 | 4.65E+00 | 2.31E-01 | | |
| A12 | GUSB | 3.79E-01 | 7.63E-02 | | |
| B01 | POU5F1 | 1.05E-02 | 6.58E+00 | | |
| B02 | IFITM1 | 7.11E-01 | 2.69E+00 | | |
| B03 | NODAL | | 9.60E-02 | | |
| B04 | DLK1 | 6.35E-04 | 5.79E-03 | | |
| B05 | KRT8 | 1.08E-03 | 1.62E-04 | | |
| B06 | TF | 4.16E+01 | 1.44E-03 | | |
| B07 | NR1H3 | 3.48E-01 | | | |
| B08 | CYP2C8 | 7.01E+00 | 1.10E-03 | | |
| B09 | ABCG2 | 6.33E-02 | 8.25E-03 | | |
| B10 | GSTA2 | 7.99E+00 | 6.18E-04 | | |
| B11 | CPS1 | 6.18E+00 | 4.67E-02 | | |
| B12 | HPRT1 | 7.90E-02 | 3.56E-01 | | |
| C01 | SOX2 | 8.79E-04 | 8.58E-01 | | |
| C02 | PODXL | 1.66E-02 | 2.39E+00 | | |
| C03 | FOXA2 | 1.53E-02 | 2.31E-04 | | |
| C04 | PROX1 | 2.87E-01 | 4.45E-03 | | |



3D Profile

グラフの上には Plate と同じ配置で Test Sample の Fold Difference および遺伝子の Symbol の表が表示されます。

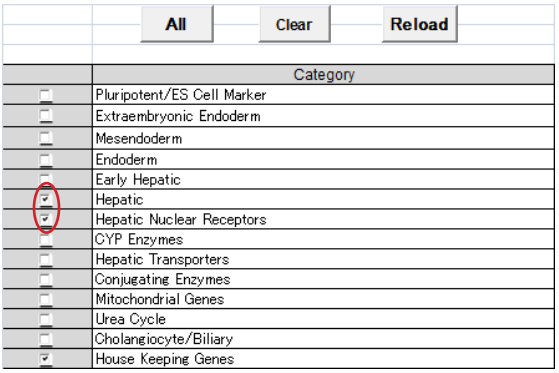
Fold Difference および遺伝子の Symbol の表は発現減少（0.5 以下）を青、変化なし（0.5 より大きく 2 未満）を灰色、発現増大（2 以上）を赤で表示しています。両サンプルもしくは一方のサンプルで Ct 値が未検出の場合は、黄色で示します。

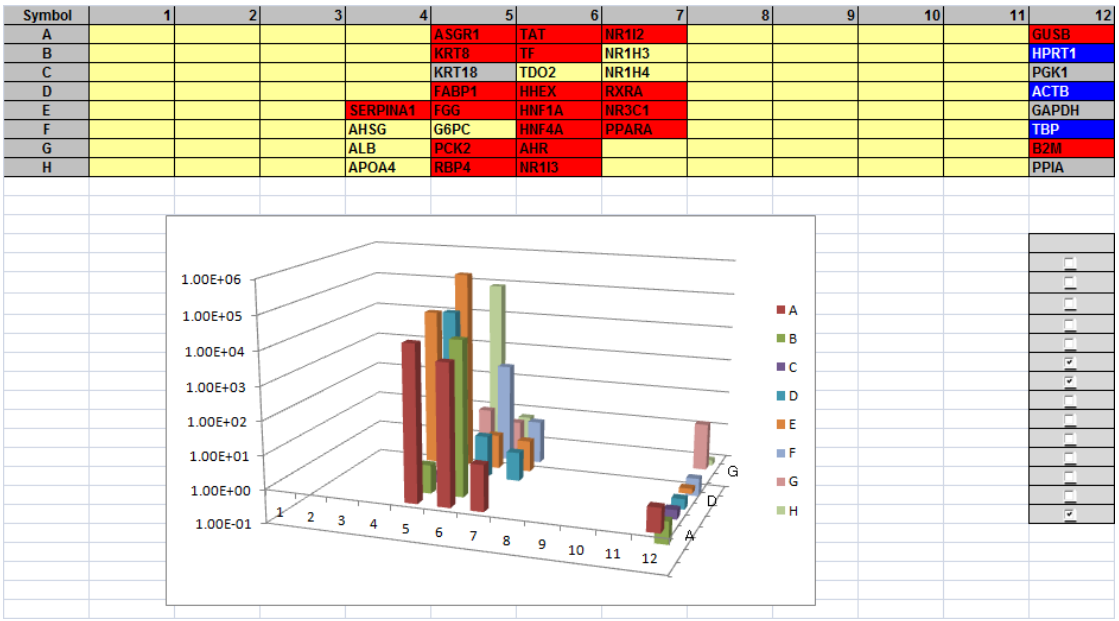
また、II.（4）において設定した Ct cutoff value 以上のデータは解析から除外されますので、同様に黄色となります。こういった場合は、必要に応じて疑似的な Ct 値を入力するか、Ct cutoff value の値を変更してください。

| 3D Profile | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 1.85E-02 | 1.57E-01 | | | 3.08E+04 | 1.12E+04 | 2.11E+01 | 7.54E+03 | 9.89E+02 | 6.75E+03 | 2.01E+01 | 4.96E+00 |
| B | 1.60E-03 | 2.64E-01 | | 1.10E-01 | 6.63E+00 | 2.89E+04 | | 6.38E+03 | 7.67E+00 | 1.29E+04 | 1.33E+02 | 2.22E-01 |
| C | 1.03E-03 | 6.94E-03 | 6.63E+01 | 6.44E+01 | 1.75E+00 | | | 5.07E+04 | | 1.14E+00 | 3.20E+01 | 5.36E-01 |
| D | 2.62E-01 | 1.30E-02 | 3.32E+00 | 2.76E+02 | 6.07E+04 | 1.64E+01 | 6.77E+00 | 1.99E+02 | 5.11E+04 | 6.93E-01 | 3.41E+01 | 4.97E-01 |
| E | 6.91E-04 | | 1.01E+01 | 3.56E+04 | 5.24E+05 | 9.78E+00 | 8.11E+00 | | | 1.70E+01 | 8.48E-02 | 7.07E-01 |
| F | 7.49E-03 | 7.41E+00 | 8.56E+01 | | | 7.19E+02 | 1.70E+01 | 1.16E+03 | | 6.97E-01 | 1.40E+00 | 2.97E-01 |
| G | | 1.26E-01 | 1.57E+01 | | 1.52E+01 | 7.62E+00 | 4.10E+02 | 3.52E+02 | | | 4.91E+02 | 2.33E+01 |
| H | | 5.73E+01 | | | 8.30E+04 | 6.19E+00 | 3.25E+04 | 8.72E-02 | 8.31E+03 | 1.98E+01 | 5.17E+00 | 6.97E-01 |

| Symbol | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | NANOG | GRB7 | GSC | CYP3A7 | ASGR1 | TAT | NR1I2 | CYP2A6 | ABCC3 | UGT1A1 | ASS1 | GUSB |
| B | POU5F1 | IFITM1 | NODAL | DLK1 | KRT8 | TF | NR1H3 | CYP2C8 | ABCG2 | GSTA2 | CPS1 | HPRT1 |
| C | SOX2 | PODXL | FOXA2 | PROX1 | KRT18 | TDO2 | NR1H4 | CYP2E1 | SLC10A1 | ATP5G1 | NAGS | PGK1 |
| D | CD9 | TDGF1 | SOX17 | TBX3 | FABP1 | HHEX | RXRA | CYP2D6 | SLC22A1 | POLG | OTC | ACTB |
| E | DNMT3B | ZFP42 | CXCR4 | SERPINA1 | FGG | HNF1A | NR3C1 | CYP3A4 | SLC22A2 | PPARGC1A | KRT19 | GAPDH |
| F | GABRB3 | SOX7 | GATA4 | AHSG | G6PC | HNF4A | PPARA | CYP7A1 | SLCO1B1 | UCP2 | KRT7 | TBP |
| G | GAL | LAMB1 | GATA6 | ALB | PCK2 | AHR | CYP1A1 | ABCB4 | SLCO1B3 | ARG1 | AQP1 | B2M |
| H | GDF3 | HNF1B | AFP | APOA4 | RBP4 | NR1I3 | CYP1A2 | ABCC1 | SLCO2B1 | ASL | HES1 | PPIA |

続いて、以下の Category List の中から目的とする Category を選択し、Reload ボタンをクリックすることで指定 Category に該当する Symbol のみに発現増減の着色が行われ、該当データの Fold Difference が棒グラフで表示されます。Category 全選択の場合は ALL ボタン、非選択の場合は Clear ボタンをクリックします。





Symbol 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A ASGR1 TAT NR1I2 GUSB
B KRT8 TF NR1H3 HPRT1
C KRT18 TDO2 NR1H4 PGK1
D FABP1 HHEX RXRA ACTB
E SERPINA1 FGG HNF1A NR3C1 GAPDH
F AHSG G6PC HNF4A PPARA TBP
G ALB PCK2 AHR B2M
H APOA4 RBP4 NR1I3 PPIA
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
1.00E-01
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A B C D E F G H

以上で解析は終了です。他のデータの解析を行う場合には、TestSampleData のシートで clear ボタンをクリックしてデータを消去し、(2) Plate の選択から始めてください。

## III. トラブルシューティング

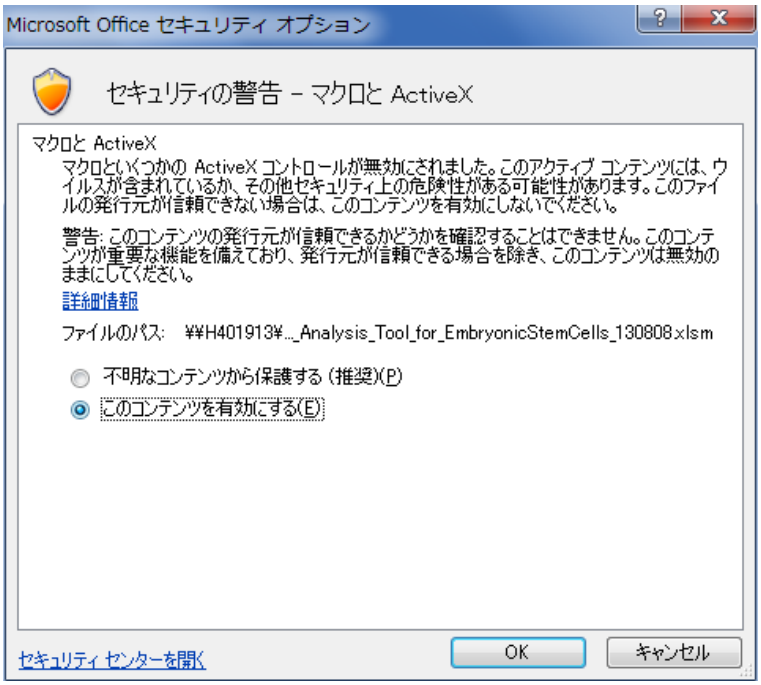
●セキュリティの警告が表示される

PrimerArray Analysis Tool for Hepatic Differentiation (Human) はマクロを含んでいるため、セキュリティの警告が表示されることがあります。その場合には、マクロを有効にする操作を行ってください。

Microsoft® Office Excel® 2007 の場合

(1) セキュリティの警告のオプションをクリックする。

(2)「このコンテンツを有効にする」を選択して、OK ボタンをクリックする。




製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社